

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



EP99/3104

REC'D 25 JUN 1999

WIPO PCT

**Bescheinigung**

Die Graffinity Pharmaceutical Design GmbH in Jena/Deutschland hat eine  
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Einrichtung für eine nahezu gleichzeitige Synthese einer Vielzahl  
von Proben"

am 23. Juni 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüngli-  
chen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole  
B 01 J, G 01 N und C 07 B der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 25. Mai 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Kolle

Aktenzeichen: 198 27 754.7

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Einrichtung für eine nahezu gleichzeitige Synthese einer Vielzahl von Proben

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft eine Einrichtung für eine nahezu gleichzeitige Synthese einer Vielzahl von Proben, welche insbesondere im automatisierten Laborbetrieb im Bereich der kombinatorischen Chemie zum Einsatz gelangt.

10

Probenpartikel ("Perlen", "Beads") werden seit Jahrzehnten für die Separation und Synthese im labortechnischen Bereich eingesetzt. Meistens handelt es sich dabei um Glas- oder Polymerkügelchen, welche Durchmesser von 0.01 mm bis 1 mm, typischerweise um die 0.1 mm, besitzen und trocken oder vorgequollen als loses Schüttgut in einen Behälter gefüllt und dann mit Flüssigkeit umspült werden, wobei zwischen der Festphasenoberfläche der Partikel und der sie umgebenden Flüssigkeit ein Adsorptions- oder Reaktionsprozeß abläuft. Verfahren der Säulenchromatographie (z.B. Gelfiltration), der Säulenextraktion, der Immundiagnostik, der Biomolekülreinigung (z.B. DNA-Reinigung) sowie der homogenen und heterogenen Synthese (von Oligonukleotiden, Peptiden oder kombinatorischen Substanzbibliotheken) nutzen diese Technik aus.

20

25

30

35

Neben der Automatisierung und Miniaturisierung von Labortechniken ist deren Parallelisierung von großem Interesse, um einen höheren Probendurchsatz zu erzielen und damit langwierige Verfahren zu beschleunigen. Zu diesem Zweck werden Proben oft in einem Raster angeordnet, so daß die Identität (Herkunft, Beschaffenheit) der Probe mit einer Flächenkoordinate verknüpft werden kann. Diese Koordinaten sind besonders für automatisierte Systeme zur Probenbearbeitung leicht zu erfassen. Für flüssige Proben sind daher sogenannte Mikrotiterplatten entwickelt worden, welche Kavitäten in rechtwinkligen Anordnungen von 8 x 12 (96 Proben), 16 x 24 (384) oder 32 x 48 (1536) tragen. Die Abmessungen der Kavitäten dieser Probenträger richten sich dabei nach den mit handelsüblichen Geräten (Pipetten) verläßlich dosierbaren

Volumina und unterliegen mit dem Fortschreiten der Dosiertechnologie einer kontinuierlichen Miniaturisierung, was durch die beliebige Aliquotierbarkeit (Aufteilung einer Mutterprobe in verschiedene Tochterproben) von Flüssigkeiten vereinfacht wird.

5

Im Rahmen der Arbeiten zur Miniaturisierung von Laborverfahren wird nach Möglichkeiten gesucht, Probenpartikel, analog zur Anordnung von flüssigen Proben, in einem zweidimensionalen Raster zu verteilen. Da die Miniaturisierung der Flüssigkeitsdosierung bereits weit fortgeschritten ist, wird somit der einzelne Partikel zur kleinsten Einheit. Weiterhin besteht die Anforderung, die hohen Stückzahlen, welche bei der Arbeit mit Partikeln üblich sind, zu bewältigen. 1 g Polymerharz enthält ca. 1 Million Partikel.

10

15 In der Patentanmeldung DE 198 19 302.5 wurde bereits eine Trägerplatte für die geordnete Aufnahme einer Vielzahl von Probenpartikeln beschrieben. Dabei sind genannte Perlen einzeln in eine Vielzahl separierter und geordnet angebrachter Kavitäten verbracht. Die Tiefe der Kavitäten so gestaltet, daß die Perlen vorzugsweise zu 50 – 80 % ihrer Höhe in den Kavitäten aufgenommen werden und sie zum Rest ihrer Höhe überragen.

20

Die Miniaturisierung genannter Trägerplatten geht einher mit der Miniaturisierung der entsprechenden Befülltechnologien und stößt bei herkömmlichen automatisierten Pipettiervorrichtungen an geometrische oder zeitliche Grenzen, da jeder einzelne Probenpartikel mit Flüssigkeit zu versorgen ist.

25

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Einrichtung für die nahezu gleichzeitige Synthese einer Vielzahl von Proben, die gebunden an Mikroperlen, welche in Kavitäten einer Trägerplatte vorliegen, anzugeben.

30

Die Aufgabe wird durch die Merkmale des ersten Patentanspruchs gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind von den nachgeordneten Ansprüchen erfaßt.

35

Die Erfindung soll nachstehend anhand schematischer Ausführungsbeispiele näher erläutert werden. Es zeigen:

- 5        Fig. 1 den grundsätzlichen Aufbau einer erfindungsgemäßen Einrichtung in perspektivischer Ansicht, sowie einer vergrößerten Detaildarstellung,  
      Fig. 2a eine seitliche Ansicht einer Einrichtung nach Fig. 1,  
      Fig. 2b eine Draufsicht auf eine Einrichtung nach Fig. 1,  
10       Fig. 3 eine Draufsicht auf eine Einrichtung nach Fig. 1 mit der Lage einer erfindungsgemäßen Abdeckung in zwei Syntheseschritten und  
      Fig. 4 eine Ausbildungsmöglichkeit einer Abdeckung mit mehreren Funktionsabschnitten in Draufsicht.

15       Ohne die Erfindung darauf zu beschränken, wird in Figur 1 von einer Trägerplatte 1 ausgegangen, bei der jeweils in einzelnen Kavitäten 11 Mikroperlen 12 derart vorgesehen sind, daß diese die Kavität überragen. Bei Verwendung von Mikroperlen mit einem Durchmesser von 100 µm  
20       ragen diese im einsortierten Zustand zwischen 20 bis 50 µm aus der Oberfläche der Trägerplatte 1 heraus. Im Beispiel gehören jeweils 9 solcher Mikroperlen zu einem Probenaufnahmebereich, wobei alle Probenaufnahmebereiche zueinander in Zeilen und Spalten ausgerichtet sind (vgl. Fig. 3). Oberhalb der perlengefüllten Trägerplatte 1 ist eine  
25       abnehmbare Abdeckung 2 vorgesehen, die als wesentlichste Elemente Stege 21 trägt, welche in ihrer Stegbreite und -länge so ausgebildet sind, daß sie bei Auflage auf die Trägerplatte 1 alle Probenaufnahmebereiche einer Zeile oder Spalte erfassen. Dabei ist, durch das in definierter Weise  
30       vorgebbare Überragen der Mikroperlen 12, ein Kapillarspalt 3 vorgegebbarer Höhe und durch die Vorgabe der Breite der Stege 21 definierter Breite geschaffen. Bei einer anderen Anordnung der Mikroperlen, bspw. mehrere Mikroperlen zurückgesetzt in einer gemeinsamen Kavität, kann ein solcher Kapillarspalt auch dadurch  
35       gebildet sein, daß die Trägerplatte 1 im Bereich der Auflage der Stege 21 und/oder die Stege 21 selbst mit Abstandshaltern definierter Höhe versehen sind.

Zur seitlichen Festlegung der derart gebildeten Kapillarspalte 3 sind die Stege 21 durch größere Ausnehmungen 22 voneinander beabstandet, die so bemessen sind, daß in ihnen keine Kapillarkräfte mehr wirken. Die Höhe des Kapillarspaltes 3, bei dem noch Kapillarkräfte zum Transport von Flüssigkeiten wirken, hängt von der Oberflächenspannung der Materialien für die Trägerplatte 1 und der Stege 21 und der zum Einsatz gelangenden Flüssigkeit ab. Bei Verwendung von Materialien wie Glas und Metall, zwischen denen ein Spalt gebildet ist, und Wasser als Flüssigkeit, wirken die Kapillarkräfte bis zu Spalthöhen von 500 µm. Eine gezielte Hydrophilisierung des Glases und/oder der Metalloberfläche läßt, bei Verwendung von Wasser, einen Flüssigkeitsstrom durch Kapillarkräfte auch bei größeren Abständen zu. Je nach der zum Einsatz gelangenden Syntheseflüssigkeit können die Stege 21 im Bereich ihrer Auflage auf der Trägerplatte mit einer hydrophilen oder hydrophoben Oberfläche versehen sein, wobei zumindest die Seitwandungen der die Stege begrenzenden Ausnehmungen 22 mit einer jeweils entgegengesetzt wirkenden Oberflächenbelegung versehen sein sollen.

Der durch die im Beispiel durch die überstehenden Mikroperlen 12 gebildete Kapillarspalt eröffnet die Möglichkeit, gezielt Flüssigkeiten entlang des Spaltes fließen zu lassen. Dabei ist im Beispiel für die Abdeckung 2 eine strukturierte Deckplatte eingesetzt, die parallele Ausnehmungen 22 aufweist. Die Ausnehmungen 22 bewirken eine Trennung von zwei zueinander parallel verlaufenden Kapillarspalten. Die Befüllung der Kapillarspalte kann erfolgen, indem an die Stirnfläche der Abdeckung, jeweils an den Anfang eines Spaltes, Flüssigkeit pipettiert wird, wie es in Fig. 1 anhand eines Spaltes mittels eines dosierbaren Flüssigkeitsspenders 4 schematisch angedeutet ist. Um jeden Kapillarspalt mit einer anderen Flüssigkeit zu befüllen, erfordert dies ein sehr sorgfältiges Pipettieren der Flüssigkeiten, um das Vermischen zweier Flüssigkeiten zu verhindern. Um eine gleichzeitige und gleichmäßig dosierte Befüllung aller Kapillarspalte 3 zu gewährleisten, ist es vorteilhafter, die Flüssigkeitszufuhr über Bohrungen 13 in der Trägerplatte 1 oder Bohrungen 25 in der Abdeckung 2, die jeweils einer Zeile und Spalte der in einer Reihe befindlichen Kavitäten vorgelagert ist, vorzunehmen. Über mit diesen Bohrungen verbundene

schlauchartige Anschlüsse 5 oder Adapterstücke erfolgt eine Verbindung zu im weiteren nicht näher dargestellten und jeweils einer Zeile oder Spalte zugeordneten Flüssigkeitsreservoirs, z.B. einer Spritzenpumpe, wobei vorteilhaft vorgesehen ist, alle Flüssigkeitsreservoirs gemeinsam mit  
5 einem einheitlichen definierten Druck zu beaufschlagen. Über solche Anbindungen können nun wohldosiert Flüssigkeiten in die Kapillarspalte eingeführt werden. Die Pumprate der Spritzenpumpe muß dabei sehr genau an die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit, getrieben durch die Kapillarkräfte, angepaßt sein, was im Einzelfall experimentell ermittelbar  
10 ist, um ein Übersprechen der Flüssigkeit von einem Kapillarspalt zum benachbarten zu vermeiden.

Wie bereits angedeutet, ist es ebenfalls möglich, die Befüllung der Kapillarspalte über die Deckplatte 2 zu realisieren. Dann sind in der Deckplatte, mittig zu den Stegen 21, die Bohrungen für die Anbindung  
15 von Schläuchen herzustellen. Eine solche Ausführung erlaubt es ebenso, anstatt von Schlauchanbindungen einen Adapter für eine Mikrotiterplatte vorzusehen, und die Befüllung der Kapillarspalte durch Ausnutzung von hydrostatischen Druckunterschieden zu realisieren.

Ein Vorteil bei Verwendung von Spritzenpumpen, verknüpft mit  
20 Schlauchanbindungen stellt die Abgeschlossenheit des Systems dar, so daß Verdunstungen vermieden werden. Dieses geschlossene System ist auch dann von Vorteil, wenn Chemikalien verwendet werden, die nicht mit Luft in Berührung kommen dürfen.

25 Mit den beschriebenen Varianten, kann eine Befüllung von beliebig vielen Zeilen mit Flüssigkeiten erfolgen. Derzeitig, in Anpassung an vorhandene Mikrotiterplatten, sind mit der beschriebenen Einrichtung 96 Zeilen gleichzeitig befüllbar. Der Anzahl an Zeilen sind dabei jedoch keine Grenzen gesetzt, und mit zunehmendem Einsatz von  
30 mikrotechnischen Bearbeitungsverfahren lassen sich weit mehr als 100 Zeilen realisieren.

Figur 2a zeigt eine Ausführung der Einrichtung nach Fig. 1 in einer  
35 vorderen seitlichen Ansicht, dabei ist die Trägerplatte 1 mit Bohrungen 13 versehen, von denen in Fig. 2a lediglich fünf dargestellt sind, an die sich schlauchartige Anschlüsse 5 anschließen, die zu nicht dargestellten

Flüssigkeitsreservoirs 4 führen. Die Trägerplatte 1 ist ihrerseits von einem Verschiebetisch V aufgenommen, der eine laterale Verschiebung parallel zur Blattnormalen ermöglicht. Die Trägerplatte 1 und die Abdeckung 2 sind weiterhin zueinander mittels einer Führung 6 verbunden. Eine solche Ausbildung ermöglicht die Aufnahme einer weiter ausgestalteten Abdeckung 2, wie sie in Fig. 2b in Draufsicht näher dargestellt ist. Neben der bisher beschriebenen transparenten Abdeckung 2, mit den ihr gegebenen Stegen 21, beinhaltet die Abdeckung 2 weiterhin einen porösen Abschnitt 23, welchem ein planarer Abschnitt 24 nachgeordnet ist, der in seiner Ausdehnung so bemessen ist, daß er die gesamte Trägerplatte 1 unter Bildung eines alle Probenbereiche erfassenden Kapillarspalt abdecken vermag, wenn dieser Abdeckungsbereich über die Trägerplatte 1 verschoben ist. Die vollständige Ausbildung einer derartigen Abdeckung allein ist in Fig. 4 dargestellt, wobei dort alternativ die Bohrungen 25 dem ersten Teil der Abdeckung 2 zugeordnet sind.

Zur eigentlichen Synthese der gewünschten Proben wird mit der beschriebenen Einrichtung wie folgt verfahren: Die mit Mikroperlen 12, die bei geeigneter Porosität bspw. ein Probenflüssigkeitsvolumen von 0,25 nl aufzunehmen vermögen, gefüllte Trägerplatte 1 der Größe  $250 \cdot 250 \text{ mm}^2$  wird mit der Abdeckung 2 mit den Ausnehmungen 22 in Kontakt gebracht. Über eine nicht näher dargestellte Justiervorrichtung werden Trägerplatte 1 und die Abdeckung 2 zueinander ausgerichtet, so daß jeweils ein hervorstehender Steg 21 auf einer Reihe mit perlengefüllten Reaktionskammern aufliegt. Die Stege 21 verbinden bspw. eine Zeile mit 96 Probenfeldern, die 864 Mikroperlen 12 tragen. Die Trägerplatte besitzt im Beispiel außerdem zweimal 96 Durchgangsbohrungen 13, die in der Verlängerung der Zeilen und Spalten der Perlenarrays liegen. An diese Bohrungen sind an der Rückseite der Trägerplatte die beschriebenen Schläuche 5 befestigt. Die 192 Schläuche führen zu den mit Chemikalien gefüllten Flüssigkeitreservoirs, bspw. Spritzen. Die Spritzen werden mit einem Spritzenantrieb gleichzeitig mit Druck beaufschlagt, und die Flüssigkeiten werden über die Schläuche 5 zu der Trägerplatte 1 transportiert. Je ein Kapillarspalt 3 wird mit jeweils einer Chemikalie befüllt. Dies wird erreicht, indem das Ende eines jeden Steges genau über einer Bohrung

sitzt, aus der die Flüssigkeit in den Kapillarspalt dringt. Die Pumprate, gesteuert durch die Spritzenantriebe muß mit der Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit korrelieren, die durch die Kapillarkräfte getrieben wird. Bei Verwendung eines etwa 30 µm hohen, 1000 µm breiten  
5 Kapillarspaltes mit einer Länge von 250 mm dauert ein Befüllvorgang ca. 3 min.

Die Trägerplatte 1 befindet sich auf dem Verschiebetisch V, der eine Bewegung parallel zu den Stegen 21 ermöglicht. Die Abdeckung soll im Beispiel hingegen während der gesamten Synthese fest arretiert sein. Im  
10 Anschluß an den ersten Syntheseschritt wird die Trägerplatte 1 unterhalb der Abdeckung 2 entlang der Stege 21 verschoben. Dabei werden die Mikroperlen an dem porösen Abschnitt 23 der Abdeckung 2 vorbeigeführt. Die Porengröße des porösen Abschnitts muß dabei deutlich geringer sein, als der Durchmesser der Mikroperlen. Das poröse  
15 Gebiet saugt die Synthesechemikalien auf und diese werden von dort mittels einer unter Unterdruck abreitenden und nicht näher dargestellten Vorrichtung ableitet und die Mikroperlen 12 auf diese Weise getrocknet. Die Trägerplatte 1 wird vollständig unter der porösen Zone vorbeigeführt, bis die gesamte Trägerplatte sich im hinteren Bereich der Abdeckung, der  
20 eine ebene Oberfläche gegeben ist, befindet. In diesem Bereich 24 erfolgt eine Drehung der Trägerplatte 1 um 90°, die für den zweiten Syntheseschritt notwendig ist. Dabei wird auch hier die Trägerplatte 1 mittels eines Drehtischs bewegt, während die Abdeckung fest eingespannt bleibt. Nach der Drehung der Trägerplatte 1 erfolgt ein  
25 Spülen der Mikrosyntheseperlen. Die Spüllösung wird ebenfalls durch Kapillarkräfte zu den Perlen transportiert. Ein erneutes Trocknen der Perlen erfolgt durch ein Überstreichen des porösen Abschnitts 23 der Abdeckung, wie oben beschrieben. Danach befindet sich die Abdeckung 2 wieder in einer Syntheseposition. Der zweite Syntheseschritt läuft nun  
30 in der gleichen Art und Weise ab, die Trägerplatte 1 liegt jedoch um 90° gedreht unter der Deckplatte, und ein weiterer Kopplungsschritt erfolgt. Weitere Kopplungsschritte sind in beliebiger Anzahl möglich. Nach der beschriebenen zweistufigen Synthese sind somit, ausgehend von 96 Zeilen und 96 Spalten, 9216 verschiedene Kombinationen von zweimal  
35 96 Substanzen entstanden. Weitere Syntheseschritte, jeweils nach einer Drehung der Platten zueinander, sind in beliebiger Anzahl möglich. Zwei



der beschriebenen Synthesepositionen sind in Figur 3 am Beispiel von sechzehn Zeilen (1 bis 16) und sechzehn Spalten (A bis Q) beispielhaft dargestellt.

- 5 Für die Abdeckung 2 hat sich als besonders vorteilhaft die Verwendung von Borofloatglas erwiesen. Um den Flüssigkeitsstrom, der sich in genannten Kapillarkanälen ausbildet visuell überwachen zu können, sollte in jedem Fall ein transparentes Material für die Abdeckung 2 gewählt werden. Das Glas zeichnet sich zudem durch eine hohe Ebenheit aus, ein wichtiges Kriterium für die Realisierung gleichmäßig dicker Kapillarspalte über eine Länge von 250 mm. In die Abdeckung sind in 10 einem ersten Bereich, unter der Voraussetzung von 96 Zeile bzw. Spalten, 97 Ausnehmungen 22 mit einem Abstand von 2,25 mm mittels Diamantwerkzeugen eingearbeitet. Die Tiefe und Breite einer 15 Ausnehmung ist so dimensioniert, daß die Ausnehmung 22 selbst nicht mehr als Kapillare wirkt. In der beschriebenen Ausführung sind dafür eine Breite von 1000 µm und eine Tiefe von 1500 µm gewählt, somit bleiben zwischen zwei Ausnehmungen Stege 21 mit einer Breite von 1,25 mm stehen. Die Verwendung anderer Materialien für die Abdeckung 20 liegt im Rahmen der Erfindung.

- Die oben beschriebene Ausbildung der Abdeckung 2 ist im Sinne der Handhabung und der Stabilität der Einrichtung die vorteilhafteste. Es liegt jedoch ebenfalls im Rahmen der Erfindung, die vorgesehenen Stege 25 durch eine parallele Anordnung von Streifen zu realisieren. Hierfür werden in Breite und Länge entsprechend dimensionierte einzelne Glasstreifen eingesetzt. Die Höhe der Streifen kann dabei beliebig gewählt sein und richtet sich nach der erwünschten Stabilität der Einrichtung. Die einzelnen Streifen werden im Abstand der 30 Probenaufnahmebereiche parallel angeordnet und an ihren Enden durch Aufkleben auf einen Trägerstreifen oder eine Trägerplatte zueinander fixiert.

Patentansprüche

1. Einrichtung für eine nahezu gleichzeitige Synthese einer Vielzahl von Proben, beinhaltend eine plane Trägerplatte (1) mit einer Vielzahl von Kavitäten (11), welche in einem wiederholenden Raster regelmäßig angeordnet sind und welche Mikroperlen (12) aufnehmen, dadurch gekennzeichnet, daß eine abnehmbare Abdeckung (2) vorgesehen ist, die mit Stegen (21) versehen ist, welche jeweils mindestens eine einer Reihe zugehörige Kavitäten (11) derart überdecken, daß zwischen den Mikroperlen (12) und den Stegen (21) ein Kapillarspalt (3) und zwischen benachbarten Stegen (21) jeweils eine größere Ausnehmung (22) verbleibt und den Kapillarspalten (3) jeweils ein dosierbarer Flüssigkeitsspender (4) zugeordnet ist.
2. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Abdeckung (2) gebildet ist durch eine transparente Platte, in die parallele Vertiefungen zur Bildung der größeren Ausnehmungen (22) eingebracht sind.
3. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapillarspalte (3) gebildet sind durch eine Beabstandung von aus den Kavitäten (11) herausragenden Mikroperlen (12).
4. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapillarspalte (3) gebildet sind durch Abstandshalter auf der Trägerplatte (1) und/oder auf den Stegen (21).
5. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Stege (21) im Bereich ihrer Auflage auf der Trägerplatte (1) mit einer hydrophilen oder hydrophoben Oberfläche versehen sind, wobei zumindest die Seitwände der die Stege (21) begrenzenden Ausnehmungen (22) mit einer jeweils entgegengesetzt wirkenden Oberflächenbelegung versehen sind.

6. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerplatte (1) und die Abdeckung (2) zueinander in einer lateral verschiebbaren und um 90° drehbaren Verbindung mittels einer Führung (6) gehalten sind.

5

7. Einrichtung nach Anspruch 1 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Abdeckung (2), den Stegen (21) nachgeordnet, ein oder mehrere poröse Abschnitte (23) und ein weiterer, die gesamte Trägerplatte (1) erfassender planarer Abschnitt (24) zugeordnet sind.

10

8. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die spaltbezogene Flüssigkeitszufuhr über Bohrungen (13), die jeweils einer Reihe von Kavitäten vorgelagert sind, in der Trägerplatte (1) erfolgt.


15

9. Einrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die spaltbezogene Flüssigkeitszufuhr über Bohrungen (25), die jeweils einer Reihe von Kavitäten vorgelagert sind, in der Abdeckung (2) erfolgt.

20

10. Einrichtung nach Anspruch 1 und 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß genannte Bohrungen (13 oder 25) mit schlauchartigen Anschlüssen (5) oder Adapterstücken versehen sind, die jeweils mit einem, mit einem definierten Druck beaufschlagbaren Flüssigkeitsreservoir (4) in Verbindung stehen.

25

  
R.-G. Pfeiffer  
-Patentanwalt-

Es folgen vier Blatt Zeichnungen

1 / 4

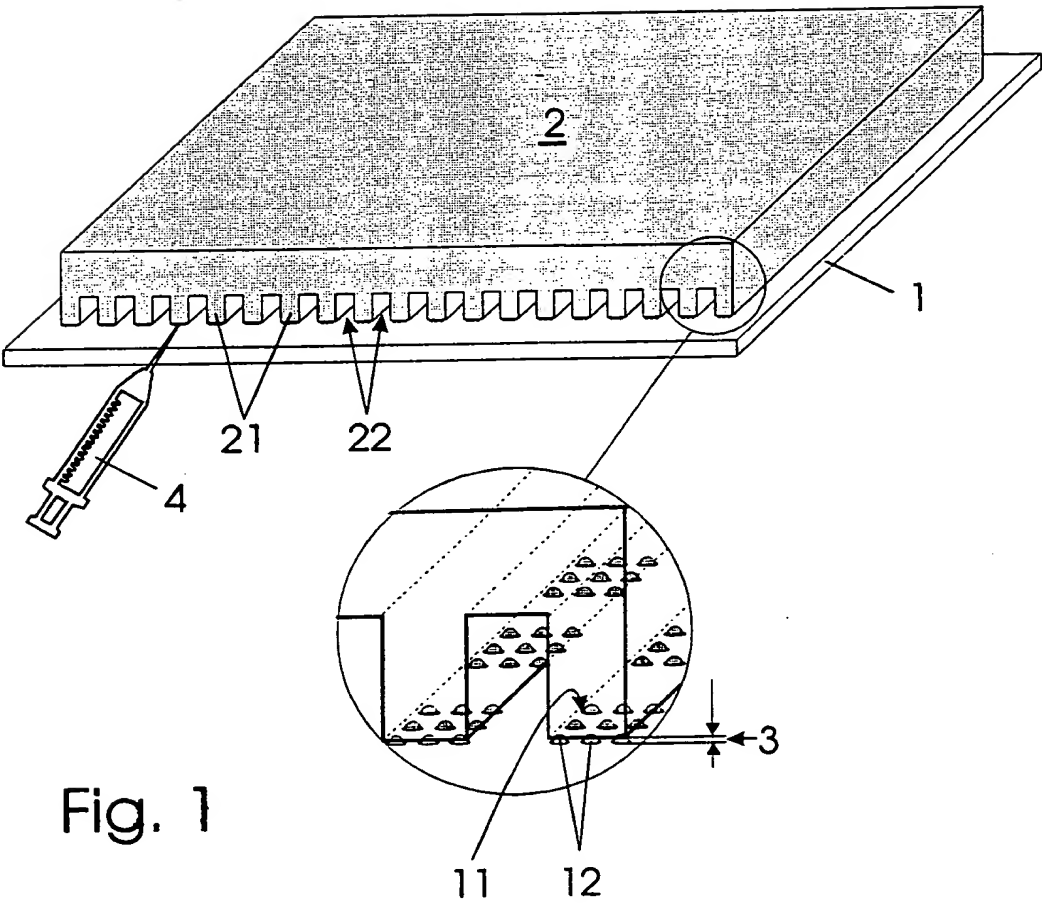
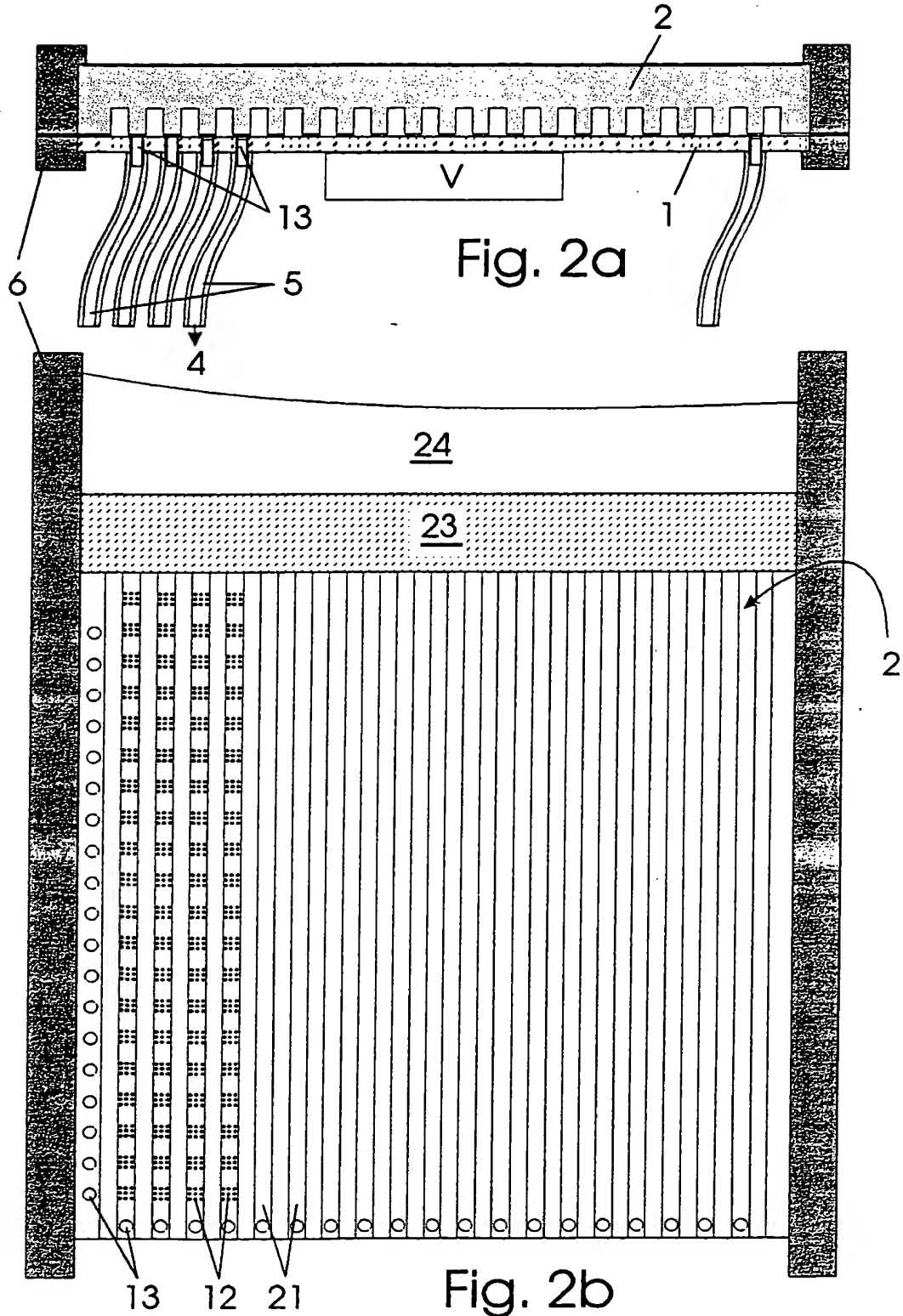


Fig. 1

2 / 4



3 / 4

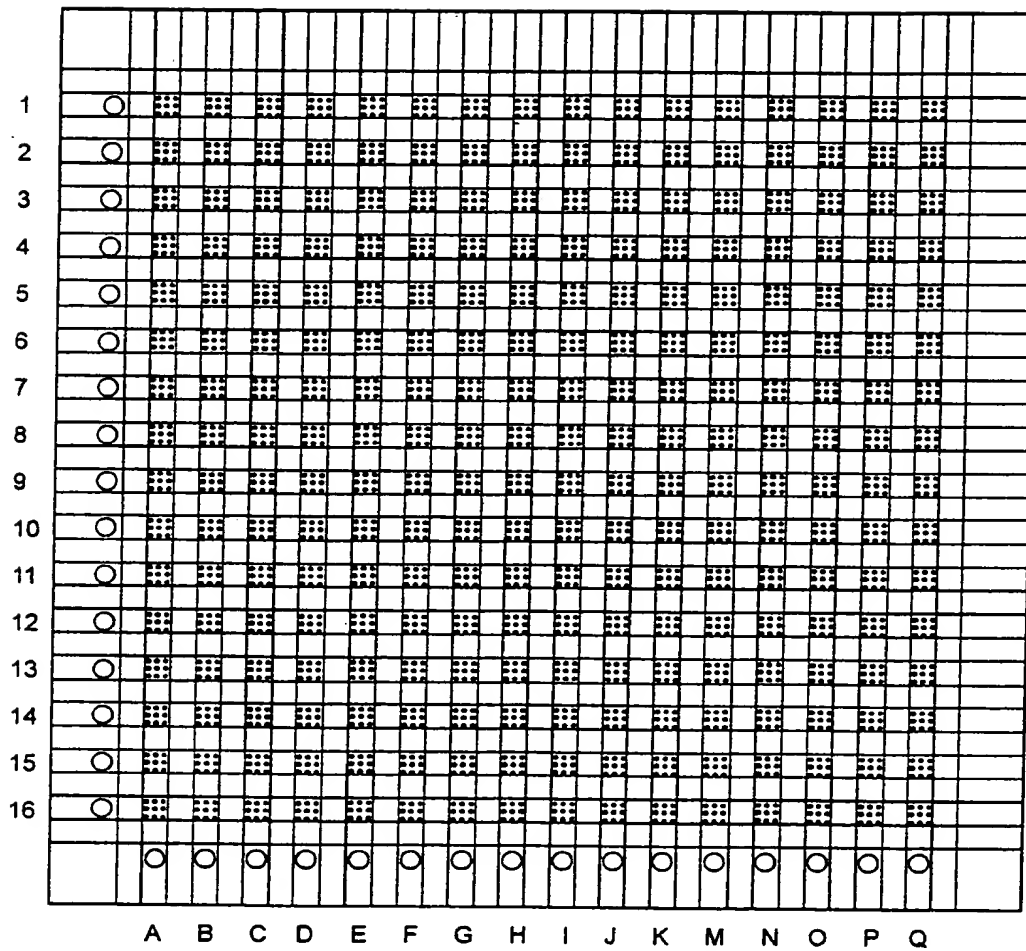


Fig. 3

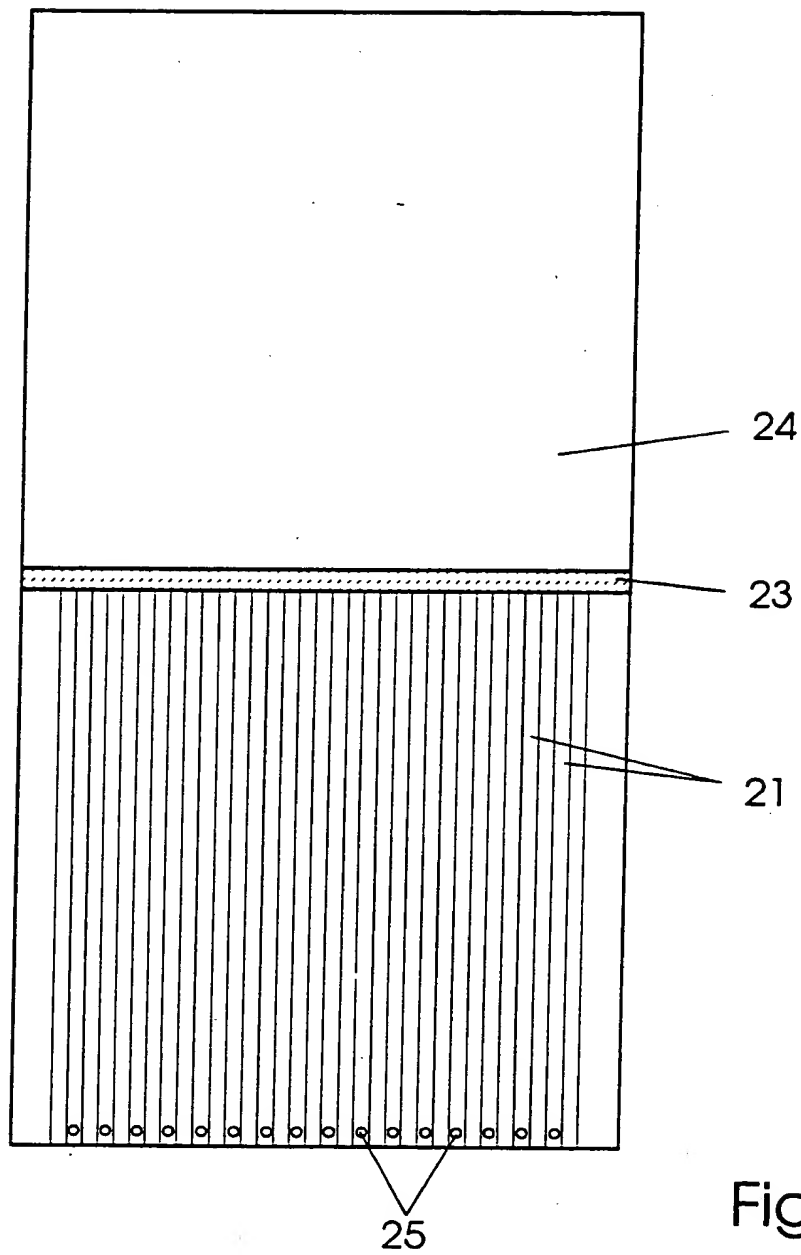


Fig. 4





PCT/EP

99/03104

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

EP99/3104

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 25 JUN 1999

WIPO PCT

**Bescheinigung**

Die Graffinity Pharmaceutical Design GmbH in Jena/Deutschland hat eine  
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Trägerplatte für die geordnete Aufnahme einer Vielzahl von  
Probenpartikeln"

am 30. April 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol  
B 01 L 3/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. Mai 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Nietadt

Aktenzeichen: 198 19 302.5



**Patentanwaltsbüro Pfeiffer & Partner, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Allemagne**  
Telefax: +49 (0)3641 823111 / Telefon: +49 (0)3641 302909

Telefaxnr. / Telefax No. / N° de télécopie	089 2195 2221
Ihr Zeichen / Your ref. / Vos réf.	
Unser Zeichen / Our sign / Nous réf.	P1006
Telefax Nachricht an: / Telefax message to: / Télécopie pour:	
Seitenzahl incl. dieser/ No. of pages incl. this one/ Nombre de pages, y compris la présente:	11

An das  
Deutsche Patentamt

80297 München

30. April 1998

- Wenn Sie keine leserlichen Kopien aller Seiten erhalten haben, unterrichten Sie uns bitte per Telefax oder Telefon.
- If you do not receive legible copies of all pages, please notify us by facsimile or telephone.
- Si vous ne recevez pas une copie lisible de toutes les pages, veuillez nous en avvertir par télécopie ou téléphone.

**Vertraulichkeit**

Dieses Telefax ist nur für die oben genannte Person bestimmt und kann vertrauliche Informationen enthalten. Wenn Sie nicht der bestimmungsgemäße Empfänger sind, beachten Sie bitte, daß jede Veröffentlichung, Vervielfältigung, Verteilung oder der Gebrauch jeglicher Information, die in diesem Telefax enthalten ist, **streng verboten** ist. Wenn Sie das Telefax versehentlich erhalten haben, unterrichten Sie uns bitte unmittelbar per Telefax oder Telefon und senden das erhaltene Telefax an uns per Post zurück. Wir danken Ihnen im voraus.

**Confidentiality Notice**

This facsimile is intended only for the person indicated above and may contain confidential information. If you are not the intended recipient, please note that any disclosure, copying, distribution or use of any information contained in this facsimile is **strictly prohibited**. If you have received this facsimile in error, please immediately notify us by facsimile or telephone and mail the original of facsimile as received to us. Thank you in advance.

**Confidentialité**

Cette télécopie est destinée uniquement à la personne mentionnée ci-dessus et peut contenir des informations confidentielles. Si vous n'êtes pas le destinataire normal vous êtes prié de noter que toute divulgation, copie, diffusion ou tout usage de toute information contenue dans cette télécopie est **strictement interdit** et engagerait votre responsabilité. Si vous avez reçu cette télécopie par erreur, veuillez avoir l'obligeance de nous en avvertir immédiatement par télécopie ou téléphone et de nous renvoyer par retour du courrier l'original de la télécopie reçue. Nous vous en remercions par avance.

**Neue Patentanmeldung**

**Titel: Trägerplatte für die geordnete Aufnahme einer Vielzahl von Probenpartikeln**

**Anmelder: Graffinity Pharmaceutical Design GmbH  
Wildenbruchstr. 15, 07745 Jena**

Probenpartikel ("Perlen", "Beads") werden seit Jahrzehnten für Separation und Synthese im labortechnischen Bereich eingesetzt. Meistens handelt es sich dabei um Glas- oder Polymerkügelchen, welche Durchmesser von 0.01 mm bis 1 mm, typischerweise um die 0.1 mm, besitzen und trocken oder vorgequollen als loses Schüttgut in einen Behälter gefüllt und dann mit Flüssigkeit umspült werden, wobei zwischen der Festphasenoberfläche der Partikel und der sie umgebenden Flüssigkeit ein Adsorptions- oder Reaktionsprozeß abläuft. Verfahren der Säulenchromatographie (z.B. Gelfiltration), der Säulenextraktion, der Immundiagnostik, der Biomolekülreinigung (z.B. DNA-Reinigung) sowie der homogenen und heterogenen Synthese (von Oligonukleotiden, Peptiden oder kombinatorischen Substanzbibliotheken) nutzen diese Technik aus.

Neben der Automatisierung und Miniaturisierung von Labortechniken ist deren Parallelisierung von großem Interesse, um einen höheren Probendurchsatz zu erzielen und damit langwierige Verfahren zu beschleunigen. Zu diesem Zweck werden Proben oft in einem Raster angeordnet, so daß die Identität (Herkunft, Beschaffenheit) der Probe mit einer Flächenkoordinate verknüpft werden kann. Diese Koordinaten sind besonders für automatisierte Systeme zur Probenbearbeitung leicht zu erfassen. Für flüssige Proben sind daher sog. Mikrotiterplatten entwickelt worden, welche Kavitäten in rechtwinkligen Anordnungen von 8 x 12 (96 Proben), 16 x 24 (384) oder 32 x 48 (1536) tragen. Die Abmessungen der Kavitäten dieser Probenträger richten sich dabei nach den mit handelsüblichen Geräten (Pipetten) verläßlich dosierbaren Volumina und unterliegen mit dem Fortschreiten der Dosiertechnologie einer kontinuierlichen Miniaturisierung, was durch die beliebige Aliquotierbarkeit (Aufteilung einer Mutterprobe in verschiedene Tochterproben) von Flüssigkeiten vereinfacht wird.

Im Rahmen der Arbeiten zur Miniaturisierung von Laborverfahren wird nach einer Möglichkeit gesucht, Probenpartikel analog zur Anordnung von flüssigen Proben in einem zweidimensionalen Raster zu verteilen. Da die Miniaturisierung der Flüssigkeitsdosierung bereits weit fortgeschritten ist, wird die kleinste Einheit einer Schüttgutprobe, der einzelne Partikel, als Maßstab gewählt. Weiterhin besteht die Anforderung, die hohen Stückzahlen, die bei der Arbeit mit Partikeln üblich sind, zu bewältigen. 1 g Polymerharz enthält ca. Million Partikel.

Eine Aliquotierung losen Schüttgutes erfolgt üblicherweise über das Befüllen einer Kavität mit nachfolgendem Abstreichen des Überschusses. Dieses Verfahren ist mit einer hohen Ungenauigkeit behaftet. Es gibt etablierte Methoden zur Partikelzählung ("Coulter Counter"), die rein analytischer Natur sind und keine definierten aliquotierten Stückzahlen erzeugen können. Demgegenüber sind Verfahren der Durchflußzytometrie geeignet, aus einer Suspension einzelne Zellen oder Partikel zu isolieren. Aufgrund der Aggregations- und Sedimentationstendenz von partikulären Objekten im Größenbereich 0.1 mm ist die hierbei Verwendung findende "sheath flow"-Verdünnungstechnik jedoch nicht geeignet für die Vereinzelung großer Stückzahlen. Zudem erfordert die Durchflußzytometrie die Aufnahme der partikulären Probe in einer Trägerflüssigkeit, was oftmals nicht wünschenswert ist. Weiterhin werden die Partikel nach der Vereinzelung in einem verhältnismäßig großen Volumen umgebender Flüssigkeit ausgegeben, wodurch der

Eintrag in auf die Partikelgröße zugeschnittene Kavitäten nur durch Realisierung entsprechend miniaturisierter Filtrationseinrichtungen möglich ist.

Andere Dosiertechniken mit stärkerer mechanischer Beanspruchung wie Förderung mittels eines Schneckengewindes, bei der Pulverdosierung üblich, werden wegen der Gefahr des Zermahlens der Partikel nur selten verwendet. Ein partikuläres Schüttgut kann nicht beliebig aliquotiert werden; die kleinste Einheit ist der einzelne Partikel.

Die Größe der Partikel spielt für ihre Manipulierbarkeit eine wichtige Rolle. Partikel in der Größenordnung 0.01 mm Durchmesser und darunter lassen sich als Suspensionen mit Flüssigkeitsdosierern wie Pipetten aliquotieren. Partikel mit Durchmessern von ca. 1 mm und darüber folgen der Gravitation und lassen sich durch Einschütten in Kapillaren oder andere Mikromanipulationsverfahren sortieren. Im Größenbereich von 0.1 mm jedoch entsteht eine besonders ungünstige Verteilung von Volumen zu Oberfläche. Eine Kugel des Durchmessers 1 mm besitzt ein Volumen von ca. 0.5 ml und eine Oberfläche von ca. 3 mm<sup>2</sup>. Dagegen weist eine Kugel des Durchmessers 0.1 mm ein Volumen von ca. 0.5 nl und eine Oberfläche von ca. 0.03 mm<sup>2</sup> auf. Da das Volumen proportional zur Masse ist, besitzen Partikel von 0.1 mm Durchmesser eine für ihre geringe Masse verhältnismäßig große Oberfläche. Dieser Effekt tritt besonders bei den weit verbreiteten Polymerharzperlen oder hochporösen Gelperlen aufgrund ihrer geringen Dichte in Erscheinung. Auch wegen der diesen Materialien eigenen Oberflächenrauigkeit neigen solche Partikel sehr zur Adhäsion, wobei Elektrostatik ebenfalls eine große Rolle spielt. In Suspensionen treten diese Adhäsionseffekte weniger stark ausgeprägt auf, jedoch neigen die Partikel zur Sedimentation und lassen sich durch Pipettiervorgänge nur schwerlich manipulieren.

Ein besonderes Problem stellt schon die Haftung der Partikel untereinander dar. Meistens liegen die Partikel als Aggregate oder Klumpen vor und lassen sich ohne mechanische Einwirkung nicht vereinzeln. Somit ist ein Partikelsortierungsprozeß in einen Vereinzelungs- und einen Verteilungsschritt zu gliedern. Es ist dabei mit bisherigen Techniken nicht zu gewährleisten, daß bei solchen mehrfachen mechanischen Kontakten Partikel mit großer Sicherheit aus ihrer Schüttung abgetrennt, vereinzelt und von der sie transferierenden Struktur zu dem sie empfangenden Objekt bewegt werden. Die Haftkräfte zwischen den Partikeln und den kontaktierenden Teilen der Transferapparatur werden auf diese Art nicht überwunden.

Für die Partikelvereinzelung und -verteilung wird im Rahmen der Erfindung eine planare Rasterplatte mit einer Vielzahl regelmäßig und mit hoher Genauigkeit angeordneter und sehr präzise auf die Durchmesser der Partikel abgestimmter Kavitäten verwendet. Die Realisierung erfolgt durch Anwendung lithografischer und galvanischer Verfahren und Ätztechniken. Bei Verwendung von 90 µm-Partikeln werden Kavitäten in der Größenordnung von 100 bis 150 µm als geeignet befunden. Hierdurch kann die lose und trockene Schüttgutprobe durch Einstreichen in das Kavitätenraster so aliquotiert werden, daß alle Einzelpartikel der Probe im Koordinatennetz der Trägerplatte präzise lokalisiert sind. Bei Abmessungen der Rasterplatte von 250 mm x 250 mm können auf diese Art Stückzahlen von 100000 Partikeln mit großer Zuverlässigkeit verteilt werden. Die Effizienz der Partikelsortierung ist überraschend.

Im Vergleich dazu wurde bereits bekannt, eine verdünnte Partikelsuspension über eine Platte mit einer Vielzahl von Kavitäten auszustreichen. Die Kavitäten waren dabei wesentlich größer als die Partikel und füllten sich statistisch mit 0 bis 4 Partikeln. Diese Variabilität bedeutet Schwankungen im Bereich 0-400% und ist gerade in Hinsicht auf die Anforderungen im miniaturisierten Labormaßstab nicht akzeptabel.

Die hier verwendeten Kavitätenraster zeichnen sich durch folgende Geometrie aus (vgl. beiliegende Figuren): den einzelnen Kavitäten ist eine runde oder quadratische Öffnung gegeben, die Öffnungen und Tiefen der Kavitäten sind in engen Toleranzen so auf die Durchmesser der Partikel abgestimmt, daß nur jeweils ein Partikel Zugang bzw. Platz findet. Der Kontaktpunkt zwischen Wandung und Partikel liegt bei einer horizontalen Translation des Partikels nicht unter der Höhe des geometrischen Schwerpunkts des Partikels.

Geeignete Kavitätsprofile besitzen Wandneigungswinkel zwischen 90 und 120 Grad (Fig. 1 definiert den Wandneigungswinkel). Die Wandungen können auch konvex oder konkav gekrümmt sein. Für konvexe Profile muß gleichfalls die Bedingung erfüllt sein, daß der am weitesten innen liegende Punkt der Wandung auf gleicher Höhe oder oberhalb des geometrischen Schwerpunkts des Partikels liegt.

Bei stufigen Profilen hat die obere Stufe einen Überhang zu bilden und den mechanischen Kontakt zu dem Partikel herzustellen. Die Höhe dieser Stufe kann im Verhältnis zur unteren verschieden sein (Fig 6a und 6b). Auch hier gilt, daß Stärke und Profil der Überhangstufe so auszuführen sind, daß oben formulierte Bedingung für die Höhe des Kontaktpunkts erfüllt ist.

In den beispielhaften, im seitlichen Schnitt durch eine einzelne Kavität dargestellten Ausführungsbeispielen, weist ein Pfeil in Richtung des Kontaktpunkts bei einer entsprechenden linksgerichteten translatorischen Bewegung. Die durchbrochenen Linie zeigt die Höhe des geometrischen Schwerpunkts des Partikels relativ zur Kavität. Die in den Figuren dargestellten rechtwinkligen Ausführungen sind idealisiert dargestellt und dienen nur der Veranschaulichung. In Schnitten real ausgeführter Objekte werden sich mehr oder weniger stark abgerundete Kanten finden.

Folgende Ausführungen werden vorstehend genannten Forderungen gerecht, ohne die Erfindung darauf zu beschränken.

Kavitäten in einem massiven ("bulk") Material mit senkrechten oder konvex geformten Wandungen, wobei letztere nicht dargestellt sind, (vgl. Figur 1) lassen sich aus Metall mittels LIGA-Technik oder Galvanik, aus Kunststoffen mittels Laserbearbeitung oder LIGA-Technik oder Photolithographie, aus Glas oder Silizium mittels Trockenätzverfahren und aus Keramik mittels LIGA-Technik herstellen.

Kavitäten in einem massiven ("bulk") Material mit Wandneigungswinkeln zwischen 90 und 120 Grad (vgl. Figur 2) oder konkav geformten Wandungen lassen sich aus Metall mittels Galvanik erzeugen.

Kavitäten in einem massiven ("bulk") Material mit Überhangwandungen (vgl. Figur 3) lassen sich aus Metall mittels Galvanik erzeugen.

5 Kavitäten in einem Zweischichtaufbau mit senkrechten oder konvex geformten Wandungen (vgl. Figur 4) sind folgenderweise aufzubauen: die obere Schicht läßt sich aus Metall mittels Galvanik oder aus Kunststoff mittels Photolithographie generieren, das Basismaterial ist frei wählbar, vorzugsweise Leiterplattenbasismaterial aus Epoxypolymer-Glasfasergewebeverbund.

10

Kavitäten in einem Zweischichtaufbau mit Wandneigungswinkeln zwischen 90 und 120 Grad oder konkav geformten Wandungen (vgl. Figur 5) sind folgenderweise aufzubauen: die obere Schicht läßt sich aus Kunststoff mittels Photolithographie erzeugen, wobei das Basismaterial beliebig wählbar ist, oder die obere Schicht läßt sich aus Silizium mittels Naßätzverfahren erzeugen, wobei das Basismaterial Glas ist, oder die obere Schicht läßt sich aus Metall mittels Galvanik aufbauen, wobei das Basismaterial beliebig wählbar

15

Kavitäten in einem Zweischichtaufbau, wobei die obere Schicht einen Überhang über der in die untere Schicht eingearbeiteten Kavität bildet (vgl. Figur 6), lassen sich in Metall mittels Galvanik auf einer metallischen Schicht aufbauen, oder sie lassen sich mittels Naßätztechnik in Glas erzeugen mit Silizium als Basismaterial, oder sie können mittels Naßätztechnik in Silizium auf Glas gefertigt werden.

20

25 Kavitäten in einem Zweischichtaufbau, wobei die gesamte Kavität mit Stufenprofil in einer Schicht ausgeführt wird und auf einer Trägerschicht ruht (vgl. Figur 7), können aus Metall mittels Galvanik oder aus Kunststoff bzw. Keramik mittels LIGA-Technik auf frei wählbaren Basismaterialien realisiert werden.

25

30 Kavitäten in einem Dreischichtaufbau mit einem Überhangprofil (vgl. Figur 8) können in Schichtfolge Metall (mittels Galvanik) auf Metall (mittels Ätzverfahren) auf einem beliebigen Basismaterial oder in Kunststoff (mittels Photolithographie) auf Metall (mittels Ätzverfahren) auf einem beliebigen Basismaterial erzeugt werden.

30

35 Als besonders geeignete Materialien, für die entsprechende Mikrostrukturierungstechnologien bekannt sind, haben sich Schichtaufbauten aus der Leiterplattentechnologie (Kupfer auf Glasfaserlaminat) bewährt. Vorteilhafterweise werden diese Schichtaufbauten durch galvanische Goldbeschichtung chemisch passiviert.

35

Beispielsweise wird auf einer planaren Grundplatte (Glasfaser/Epoxy) eine vorzugsweise metallische Schicht (Kupfer) aufgebracht. Diese Schicht wird mit einer Photoresistfolie beschichtet. Mittels eines Photolithographieprozesses werden runde Strukturen mit dem Durchmesser der Perlen oder wenig größer belichtet. Nach dem Herauslösen der belichteten Bereiche der Photoresistfolie wird die darunterliegende Metallschicht geätzt. Dabei wird die Folie unterätzt und damit eine bspw. in Fig. 8 beschriebene Geometrie hergestellt. Die Tiefe des Schichtaufbaus aus Metallschicht und Folienresist kann je nach Durchmesser der Perle und/oder der gewünschten Einbringtiefe der Perle variiert werden.

40

45

Ein weiterer Prozeß der Herstellung der gewünschten Lochstrukturen verwendet die galvanische Abscheidungen von Metallen. In diesem Fall wird auf einer metallischen Unterlage, die als Startschicht für die galvanische Abscheidung dient, eine Photoresistfolie aufgebracht und so strukturiert, daß nur runde Felder, die den Durchmesser der gewünschten Lochstruktur aufweisen, stehenbleiben. In einem galvanischen Bad wird eine Schicht an den Stellen aufgebaut, an denen sich kein Resist auf der Startschicht befindet. Nach einer ersten galvanischen Abscheidung mit Material A wird ein zweites Material B auf der ersten Schicht weiter abgeschieden. Material B dient nach dem Lösen der Strukturen der Photoresistfolie als Ätzmaske für Material A, um z. B. die Startschicht unterhalb der vorherigen Photoresistfolie wegzuzätzen. Damit wird die Kante des Materials B geringfügig unterätzt, um damit bspw. eine der in Fig. 6a dargestellten Strukturen herzustellen. Bei Verwendung einer Photoresistfolie mit genau der Schichtdicke, die auch die Tiefe des Lochstrukturen haben sollen, genügt ein einmaliger Galvanikprozeß. Die entstehenden Strukturen weisen dann senkrechte Wände auf.

weitere Technologie zur Herstellung runder, weitgehend senkrechter Kavitäten nutzt die Strukturierung von photosensiblen Glas. Mittels einer Photoschablone werden alle gewünschten Strukturen gleichzeitig im Glas belichtet und die belichteten Gebiete in einem nachfolgenden Temperprozeß kristallisiert. Diese kristallinen Bereiche können dann in verdünnter Flußsäure geätzt werden. Die Tiefe der geätzten Bereiche kann je nach Perlendurchmesser und gewünschter Einbringtiefe durch die Ätzzeit eingestellt werden. Mit diesem Verfahren lassen sich kleinste Strukturen von 10 µm mit einem Wandneigungswinkel von über 87 Grad herstellen. Platten aus diesem Glas sind in beliebigen Dicken und Größen erhältlich.

In Trägermaterialien aus Polymeren lassen sich auch senkrechte Kavitäten durch Laserablation herstellen. Vorteil der Laserablation gegenüber Laserabtragsverfahren, die die Materialien über die Phasen Schmelzen und Verdampfen bearbeiten, ist die Fertigung von Kavitäten ohne Randaufwölbung oder Ablagerungen. Mit diesem Verfahren lassen sich durch Verwendung von Blenden gleichzeitig mehrere Kavitäten herstellen, jedoch ist der Bereich begrenzt auf wenige Quadratzentimeter. Somit erfolgt die Bearbeitung der gesamten Platte seriell. Für die Bearbeitung einer Platte von 250 x 250 mm<sup>2</sup> mit 100000 Kavitäten kann die Bearbeitung mit einem Excimerlaser bis zu 8 Stunden dauern.

Für die Fertigung sehr großer Stückzahlen von Probenträgern kann auch die LIGA-Technik verwendet werden. Dabei wird in eine PMMA-Schicht mittels Belichtung durch Synchrotronstrahlung oder Laserlicht senkrechten Löchern hergestellt. In einem Galvanikprozeß werden diese Löcher von einer leitfähigen Platte startend mit Metall aufgefüllt. Die PMMA Schicht wird entfernt und die galvanisch hergestellte Platte wird als Mutterplatte zum Abformen von polymeren Materialien verwendet.

Die Herstellung von Kavitäten, deren obere Öffnung kleiner ist als der Boden der Kammer (Fig. 2, Fig. 5), kann bspw. mit Hilfe von anisotrop geätztem Silizium, verbondet mit Glas realisiert werden. Die Dicke des Siliziumwafers muß dann genau der erforderlichen Tiefe der Kavität entsprechen. Durch einen photolithographischen Prozeß werden in eine



Siliziumdioxid- oder Siliziumnitridschicht auf dem Silizium quadratische Strukturen eingebracht, deren Kantenlänge nur wenig größer (im Bereich von  $10\text{ }\mu\text{m}$  bis  $50\text{ }\mu\text{m}$ ) ist als der Durchmesser der verwendeten Perlen. In einem anisotropen Ätzprozeß werden durchgängige Strukturen hergestellt, die nach unten verjüngend verlaufen und einen Wandneigungswinkel von  $125^\circ$  aufweisen. Die so entstandenen Strukturen können zum Einfangen der Partikel verwendet werden, indem die geätzte Siliziumscheibe mit der bisherigen Oberseite auf einen Glaswafer gebondet wird. Damit entsteht eine Struktur, wie sie in Fig. 5 dargestellt ist. Durch gängige andere Ätztechniken, die sich nicht an der kristallografischen Struktur orientieren, ist es ebenfalls möglich, den gewünschten Kavitäten die oben beschriebene kreisrunde Form in Draufsicht zu geben. Die hier beschriebene Ausführung stellt bezogen auf die zum Einsatz gelangenden Materialien keine Beschränkung der Erfindung dar. Grundsätzlich sind für die Schicht S alle Materialien geeignet, die die Einbringung von Kavitäten mit sich zur Befüllungsrichtung leicht verjüngenden Querschnitten erlauben und die für die vorgesehenen Anwendungsfälle inert sind. Insbesondere kann die Schicht S auch durch einen durchgängig auf das Substrat aufgetragenen Fotoresist gebildet sein.

Die Vorteile der Ausrichtung von einer Vielzahl von Proben in einem Raster sind bereits vorstehend diskutiert. Es wäre noch hinzuzufügen, daß neueste z.T. noch exploratorische Entwicklungen in der Flüssigkeitsdosierung Einzeltropfen generieren können. Diese Einzeltropfen entsprechen in ihrem Volumen ungefähr dem der hier diskutierten  $0.1\text{ mm}$ -Durchmesser Partikel. Somit können die Partikel in der beschriebenen Trägerplatte individuell mit Flüssigkeit benetzt werden, ohne daß es zu einem Übersprechen zwischen den Kavitäten kommt.

Weiterhin ist es mit dem beschriebenen Probenträger möglich, nicht nur ein Aliquot sondern die Gesamtheit einer Schüttgutprobe vollständig zu vereinzeln. Dies ist besonders für bioanalytische Fragestellungen von Interesse, bei denen die Partikel bereits durch vorangestellte Verfahren ("split/mix"-Synthese) diversifiziert wurden.

Präzise Lokalisierung einer Vielzahl von Partikeln erlaubt es, eine Einzelmanipulation, wie in der automatisierten Bestückungstechnologie üblich, einzusetzen. Für diese "pick and place" Operationen ist es unumgänglich, daß die Objekte bereits vereinzelt und präzise positioniert in einer Rasteranordnung oder linienförmig aufgereiht vorliegen.

Zusätzlich ist es möglich, in solchen Transferschritten nicht nur einzelne Partikel sondern ganze Teilbereiche des Partikelarrangements auf komplementäre Rasterformate umzusetzen. Diese parallele Vorgehensweise ist nicht nur schneller, sondern erlaubt es, die Partikel mit den verschiedenen von den Flüssigkeitsprobenträgern vorgegebenen Rastermaßen in Übereinstimmung zu bringen. Dabei können von einer Mutterplatte (mit z.B. 9216 Partikeln) ausgehend mehrere Tochterplatten (24 Platten zu je 384 Partikeln) angefertigt und mit den Flüssigkeitsprobenträgern im entsprechenden 384er Raster in Verbindung gebracht werden. Derartige Transferv Verfahren sind in der Bestückungstechnologie bekannt und beruhen üblicherweise auf dem Einsatz adhäsiv beschichteter Manipulatoren.



Die präzise Lokalisierung der Einzelpartikel ist auch Voraussetzung für die Herstellung genau bestimmter (abgezahlter) Partikelteilmengen. Vorteilhafterweise können solche Aliquote bereits in die Rastergeometrie eingearbeitet werden. Beispielsweise sind auf einer Platte 9216 Felder mit jeweils neun Einzelpartikelkavitäten (vgl. Fig. 12, die einen Ausschnitt einer Trägerplatte in Draufsicht darstellt) angeordnet, wodurch insgesamt 82944 Kavitäten erhalten werden. Die Abstände zwischen den neun Kavitäten in einem Feld (typischerweise 0.15 mm) sind dabei geringer als die Abstände der Felder untereinander (typischerweise 2 mm). Auf diese Art lassen sich Teilmengen an Partikeln leichter zusammenfassen und adressieren.

10 Die im Raster verteilten Partikel lassen sich auch wie in der sonst üblichen säulenartigen Anordnung mit flüssigen Reagenzien benetzen und umspülen. Die Vereinzelnung und Ausrichtung der Perlen bleibt dabei erhalten, wenn die Einzelpartikelkavitäten entsprechend unterschrittene Geometrien aufweisen, so daß die Partikel beim Quellvorgang durch die Vergrößerung ihres Volumens in den Kavitäten arretiert werden oder wenn eine aufliegende Deckplatte eine Spaltöffnung nicht über dem Durchmesser aufweist.

Ganz besonders vorteilhaft ist es, diese Spaltöffnung durch die Partikel selbst zu generieren. Dabei ist die Tiefe der die Partikel haltenden Kavitäten geringer als der Durchmesser der Partikel. Somit stehen Partikel des Durchmessers 0.1 mm bei einer Tiefe der Kavität von 0.07 mm genau um 0.03 mm aus der Trägerplatte heraus, wie es in Fig. 10 angedeutet ist. Beim Auflegen einer Deckplatte bildet sich ein wohldefinierter Spalt zwischen Deck- und Trägerplatte aus, welcher sich in Gegenwart von Flüssigkeit durch Kapillarkräfte selbst befüllt. So kann eine sehr viel gleichmäßigere und besser kontrollierbare Flüssigkeitsverteilung als bei säulentechnischen Verfahren erreicht werden. Packungsdefekte beim Eintragen des partikulären Schüttgutes in eine Trägersäule können in der hier vorgestellten planaren Ausführung nicht auftreten.

30 Die Ab- oder Zufuhr von Flüssigkeiten kann bspw. auch durch die Böden der die Partikel haltenden Kavitäten tragen. Hierfür sind in dem Basismaterial unter den Kavitäten verteilte und präzise lokalisierte Ausnehmungen vorgesehen (vgl. Fig. 9b) oder es ist eine speziell hierfür vorgesehen Zwischenschicht eingeführt (vgl. Fig. 9a). Dabei ist der nun ausgedünnte Kavitätsboden mit Perforationen versehen. Die Porosität ist mit beschriebenen mikrostrukturtechnischen Verfahren zu erzielen und so eingerichtet, daß die Partikel von der Siebstruktur zurückgehalten werden und Flüssigkeiten beim Anlegen eines Vakuums abgesaugt werden können. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform verwendet in der Leiterplattentechnik übliches Glasfaser-Epoxydaminat. Nach Auflösung des Laminatbindemittels ergibt sich die Möglichkeit der Zufuhr bzw. Ableitung von Probenflüssigkeit durch das freigelegte Glasfasergewebe.

Ein weiterer Vorteil ist, daß präparative Reinigungsverfahren drastisch vereinfacht werden können. Üblicherweise werden Partikel für die Chromatographie in eine Säule gepackt, und die zu trennenden gelösten Bestandteile werden nach Durchquerung der Säule mit Hilfe von Fraktionssammlern aliquotiert und aufgefangen. Bei der Trennung auf der Säule unterliegt die zu trennende Lösung jedoch einer beträchtlichen Verdünnung und die

P1006

interessierenden Bestandteile in den gesammelten Fraktionen müssen mit erheblichem Arbeitsaufwand eingeeengt werden. Bei Verwendung einer Einzelpartikelträgerplatte ist es nicht nötig, das Eluat aufzufangen. Stattdessen kann die Deckplatte abgehoben werden, und die Partikel, welche die interessierende Gemischkomponente adsorptiv oder durch Affinität gebunden haben, werden selektiv durch oben beschriebene Transfervverfahren in Probengefäße für weitere Umsetzungen oder analytische Arbeiten überführt. Die Deckplatte kann auch durch Dichtungen oder Kontaktstrukturen eine feste, für Flüssigkeiten nicht passierbare Verbindung mit der Partikelträgerplatte eingehen. So können beispielsweise planare Mikrosäulen geschaffen werden, welche unter Druck zu betreiben sind.

Ganz besondere Vorteile entfaltet die Einzelpartikelträgerplatte, wenn sehr komplexe Synthese- oder Analyseaufgaben zu bewältigen sind. Es ist denkbar, die Trägerplatte in definierter räumlicher Gliederung mit Partikeln unterschiedlicher adsorptiver oder reaktiver Eigenschaften zu belegen. Dadurch kann noch vor weiteren naßbiologischen oder chemischen Prozeßschritten eine erhebliche Strukturvielfalt eingebracht werden.

Die enormen Vorteile dieser Art der Zusammenstellung der räumlich aufgelösten, biologischen und/oder physikochemischen Eigenschaften eines planaren Trägers liegen:

- in der Flexibilität, mit der unterschiedliche Partikel ausgewählt und arrangiert werden können,

- in der Qualitätskontrolle der Partikeleigenschaften, da partikuläre Proben herkömmlicherweise in großen Stückzahlen gefertigt werden, gut charakterisiert sind und kaum Varianzen zwischen den Partikeln aufweisen, wenn sie aus einer Charge stammen
- in der Analysierbarkeit der Einzelpartikel nach erfolgter biologischer oder chemischer Umsetzung, da die Einzelpartikel von Interesse entnommen, untersucht und wieder zurückgelegt werden können, ohne die Integrität der Trägerplatte zu zerstören.

Sogenannte Gen- oder Biochips lassen sich auf diese Art in großen Stückzahlen und guter Reproduzierbarkeit herstellen, indem bereits mit optimierten Gensonden ausgestattete Partikel auf dem Träger plziert und mit der DNA-Probe von Interesse inkubiert werden.

Es ist besonders vorteilhaft ist die zweidimensionale Anordnung von Partikeln für hochparallele und kombinatorische Verfahren. Hierbei werden Bereiche der Trägerplatte gleichzeitig oder in Folge mit unterschiedlichen flüssigen Proben benetzt. Die Verwendung von passend geschnittenen oder strukturierten Deckplatten bewirkt die Entstehung eines selbstbefüllenden Kapillarspaltes nur an den dafür vorgesehenen Bereichen. Beispielsweise können durch eine mit Längsrillen versehene Deckplatte auf einer quadratischen Trägerplatte im 96 x 96 Raster abwechselnd die Partikel im Zeilen- und Spaltenmuster mit jeweils 96 verschiedenen Flüssigkeiten benetzt werden. Diese "orthogonal" genannte Flüssigkeitsverteilung ist in der kombinatorischen Chemie gebräuchlich für die Synthese von Substanzbibliotheken.

  
R.-G. Pfeiffer  
-Patentanwalt-

Es folgen zwei Blatt Zeichnungen

Fig 1.

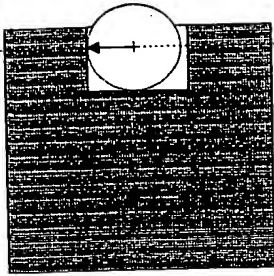


Fig 6a.

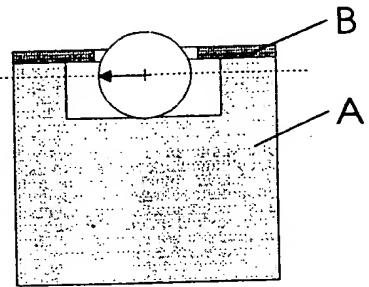


Fig 2.

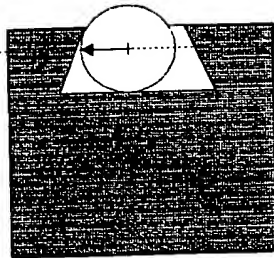


Fig 6b.

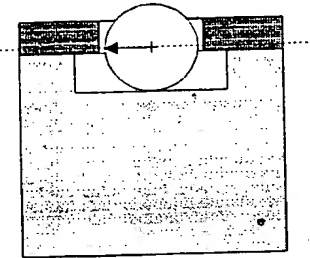


Fig 3.

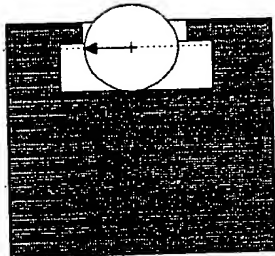


Fig. 7

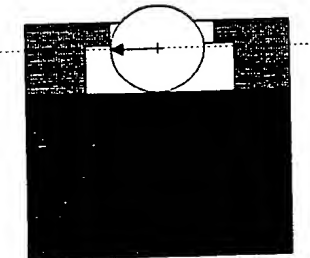


Fig 4.

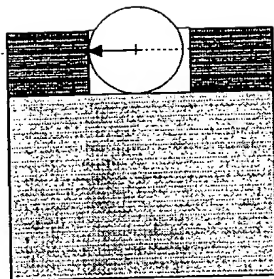


Fig 8.

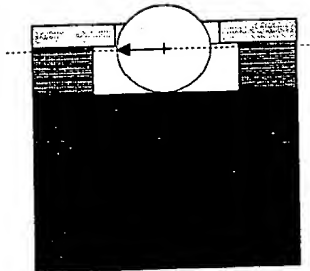


Fig 5.

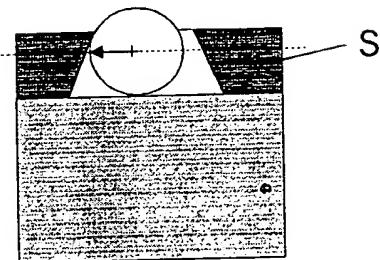


Fig. 9a

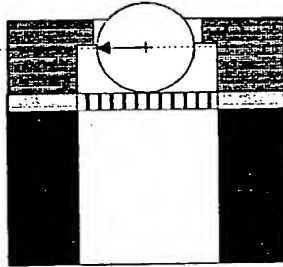


Fig. 10

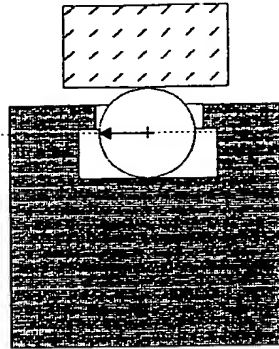
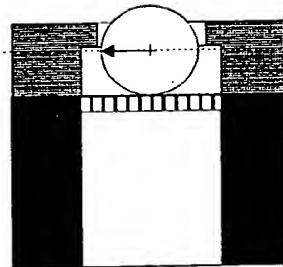
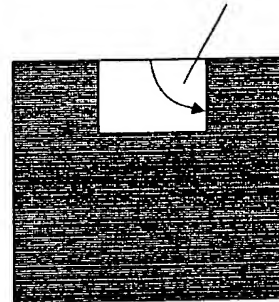


Fig. 9b



Wandneigungswinkel

Fig. 11



Kavitäten

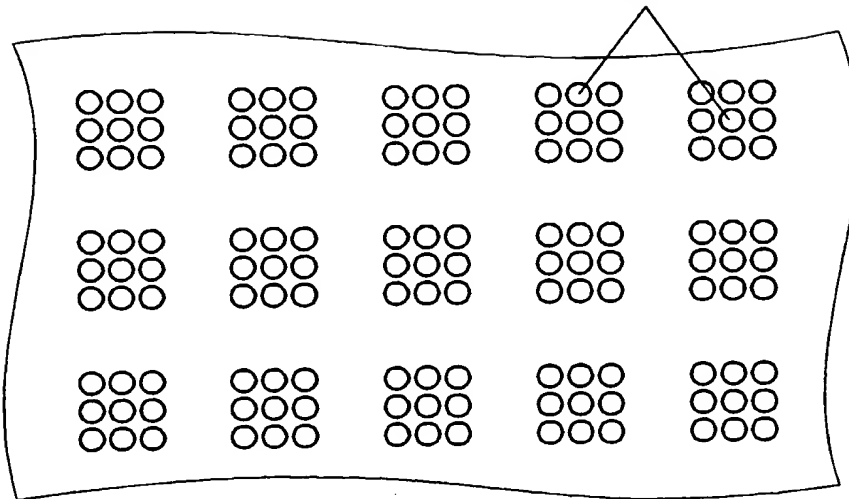


Fig. 12